植物分类学报 41(2):173–179(2003)
Acta Phytotaxonomica Sinica

基于ITS序列探讨杜鹃花属马银花组的系统发育

高连明　李德铢*　张长芹

（中国科学院昆明植物研究所生物多样性和生物地理开放实验室　昆明 650204）

Phylogenetic relationships of *Rhododendron* section *Azaleastrum*（Ericaceae）based on ITS sequences

GAO Lian-Ming　LI De-Zhu*　ZHANG Chang-Qin

（*Laboratory of Plant Biodiversity and Biogeography*，*Kunming Institute of Botany*，*the Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China）

Abstract　The subgenus *Azaleastrum* Planch. of *Rhododendron* L.（Ericaceae）was traditionally divided into two sections，i. e. sect. *Azaleastrum*（Planch.）Maxim. and sect. *Choniastrum* Planch. The internal transcribed spacer（ITS）regions of nuclear ribosomal DNA from seven species and one variety of subg. *Azaleastrum* were sequenced. The ITS sequences of these taxa，together with those of two species of sect. *Choniastrum* and two related monotypic subgenera，subg. *Mumeazalea* Maxim. and subg. *Candidastrum*（Sleumer）Philip. & Philip.，were analyzed to reconstruct the phylogeny of the sect. *Azaleastrum* using PAUP4.0b8，with *R. redowskianum* Maxim. of subg. *Therorhodion*（Maxim.）Gray as outgroup. Six most parsimonious trees with a length $=60$，a $CI=0.917$，and an $RI=0.898$ were obtained by the maximum parsimony analysis when the gaps were treated as missing. The topology of the strict consensus tree was identical with that of the maximum likelihood analysis with slightly different bootstrap values. Subg. *Candidastrum* was nested in the basal position. Subg. *Azaleastrum* was not monophyletic，but both sect. *Azaleastrum* and sect. *Choniastrum* were monophyletic groups with bootstrap values of 81% and 100% respectively. Sect. *Azaleastrum* was divided into two clades with bootstrap values of 93% and 62% respectively. Subg. *Mumeazalea* was resolved as sister to sect. *Azaleastrum*.

Key words　*Rhododendron*，section *Azaleastrum*，ITS，phylogeny.

摘要　以杜鹃花属叶状苞亚属 *Rhododendron* subg. *Therorhodion*（Maxim.）Gray **的叶状苞杜鹃** *R. redowskianum* Maxim.**为外类群，使用** PAUP4.0b8 **软件对马银花亚属** subg. *Azaleastrum* Planch.**的马银花组** sect. *Azaleastrum*（Planch.）Maxim. 7 **种** 1 **变种和长蕊杜鹃组** sect. *Choniastrum* Planch. 2 **种及** 2 **个相关的单型亚属（异蕊杜鹃亚属** subg. *Mumeazalea* Maxim.**和纯白杜鹃亚属** subg. *Candidastrum*（Sleumer）Philip. & Philip.**）进行了系统发育分析。采用最大简约法分析获得** 6 **个最简约树，步长为** 60，**一致性指数（***CI***）和维持性指数（***RI***）值分别为** 0.917 **和** 0.898，**利用** 6 **个最简约树获取严格一致树。用最大似然法获得的系统树与严格一致树完全相同，只是支持率略有不同。结果表明纯白杜鹃亚属位于系统树的基部；马银花亚属不是一个单系类群，但马银花组和长蕊杜鹃组分别构成单系，支持率分别为** 81% **和** 100%；**在马银花组内形成两个分支，内部支持率分别为** 93% **和** 62%**。异蕊杜鹃亚属与马银花组构成姐妹群关系。**

关键词　杜鹃花属；马银花组；ITS；**系统发育**

2002-07-10 **收稿**，2002-12-24 **收修改稿**。

基金项目：中国科学院知识创新工程生物领域重要方向项目（KSCX2-1-06B）（Supported by a Keynote Project of Biology of the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences（Grant No. KSCX 2-1-06B））.

* **通讯作者**（Author for correspondence. E-mail：< dezhuli@hotmail.com >）。

杜鹃花属 *Rhododendron* L.植物大多是世界上著名的观赏花卉,具有很高的经济价值。马银花组 sect. *Azaleastrum* 隶属于杜鹃花属马银花亚属 subg. *Azaleastrum*,有 9 种 2 变种,除 1 种产缅甸东北部外,其余 8 种 2 变种分布于中国华东、华中、华南及西南等省区,我国长江以南各省区是马银花组的现代分化和分布中心(何明友等,1994)。Sleumer(1949,1980)将马银花亚属分为 4 个组,即马银花组 sect. *Azaleastrum*、长蕊杜鹃组 sect. *Choniastrum*、异蕊杜鹃组 sect. *Mumeazalea* 和纯白杜鹃组 sect. *Candidastrum*。Philipson (1980) 和 Philipson 和 Philipson(1986) 根据雄蕊二型、落叶习性及地理分布等特征,将单型组异蕊杜鹃组和纯白杜鹃组提升为亚属等级。Philipson 和 Philipson(1986)在对马银花亚属修订时,只对马银花 *R. ovatum*、薄叶马银花 *R. leptothrium*、白马银花 *R. hongkongense*、红马银花 *R. vialii* 和缅甸马银花 *R. ngawchangense* 5 个种进行了特征描述和讨论,将腺萼马银花 *R. bachii* 和长卵叶马银花 *R. lamprophyllum* 归并入马银花,但对我国学者发表的杭州马银花 *R. hangzhouense* (方文培,何明友,1982)、墨脱马银花 *R. medoense* (方文培,何明友,1983)、头巾马银花 *R. mitriforme* (谭沛祥,1982)、田林马银花 *R. tianlinense* 和桂东杜鹃 *R. sanidodeum* (谭沛祥,1983a) 5 个新种作为存疑种处理。何明友等(1994)在《中国植物志》中对该组进行了修订,认为马银花组包括 9 种 2 变种,但将腺萼马银花作为独立的种处理。目前对马银花组的研究仅限于经典的形态分类方面(何明友等,1994;Philipson & Philipson,1986;谭沛祥,1983b;Sleumer,1949),有关本组的系统演化及分子系统学方面的研究还未见报道。马银花组在经典分类方面也存在较多分歧,在对一些种的分类处理方面尤其如此。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列由于可以提供较丰富的信息位点,已被广泛用于研究被子植物属内种间、近缘属间乃至科内的系统发育和分类问题(田欣,李德铢,2002;Baldwin et al.,1995)。ITS 序列在研究杜鹃花属内组间关系也得到了较好的应用(高连明等,2002)。本文通过对马银花组 7 种 1 变种的 ITS 序列的分析,从分子角度探讨马银花组的系统演化关系,试图为该组的系统学和分类学研究提供新的证据。

1 材料和方法

1.1 材料

对杜鹃花属马银花组 5 种 1 变种和长蕊杜鹃组 2 种及外类群叶状苞杜鹃 *Rhododendron redowskianum* Maxim.进行了 ITS 区全序列测定,另外 4 种杜鹃花的 ITS 区序列从 GenBank 获得,序列号和实验材料见表 1。凭证标本保存于中国科学院昆明植物研究所标本馆(KUN)。

1.2 总 DNA 的提取、PCR 扩增和 DNA 测序

取硅胶干燥的上述植物叶片 0.1 g 左右,采用改良的 CTAB 法(Doyle & Doyle,1987)提取总 DNA。聚合酶链式反应(PCR)在 PERKIN ELMER 9600 型 PCR 仪上进行,用 White 等(1990)的引物进行 ITS 区的扩增。PCR 程序为:97 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 1.5 min,72 ℃延伸 2 min,30 个循环;扩增产物用 Watson 公司纯化试剂盒进行纯化。测序反应依据双脱氧链终止法(Sanger et al.,1977)原理,在上述 PCR 仪上进行。反应程序为:96 ℃变性 10 s,50 ℃退火 5 s,60 ℃延伸 4 min,30 个循环,反应体系为 5 μL。产物纯化后经热变性于ABI310型自动测序仪进行序列测定。为保证测序的准确性,对ITS序列

表 1　材料来源

Table 1　Source of material of *Rhododendron* studied (following the classification of Chamberlain et al. (1996))

类群 Taxa	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	序列接收号 GenBank Acc. No.
Subgenus *Azaleastrum*			
Section *Azaleastrum*			
R. ovatum (Lindl.) Planch. ex Maxim.	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	Gao L. M. 2191	AF393424
R. bachii Lévl. (I)	广西金秀 Jinxiu, Guangxi	Gao L. M. 20052	AF452228
R. bachii Lévl. (II)	广西灵川 Lingchuan, Guangxi	Gao L. M. 20086	AF393419
R. lamprophyllum Hayata		from GenBank	AF285855
R. hongkongense Hutch.		from GenBank	X97423
R. mitriforme Tam	广西金秀 Jinxiu, Guangxi	Gao L. M. 20064	AF393422
R. mitriforme var. *setaceum* Tam	广西猫儿山 Mao ’er Shan, Guangxi	Gao L. M. 20074	AF393423
R. leptothrium Balf. f et Forrest	云南腾冲 Tengchong, Yunnan	Zhang Q. T. 20049	AF393420
R. vialii Delavay et Franch.	KIB* (cultivated)	Gao L. M. 20028	AF393421
Section *Choniastrum*			
R. stamineum Franch.	KIB* (cultivated)	Gao L. M. 20016	AF393435
R. tutcherae Hemsl. et Wils.	云南屏边 Pingbian, Yunnan	Gao L. M. 2102	AF393436
Subgenus *Mumeazalea*			
R. semibarbatum Maxim.		from GenBank	X96812
Subgenus *Candidastrum*			
R. albiflorum Hook.		from GenBank	X97427
Subgenus *Therorhodion*			
R. redowskianum Maxim.	吉林长白山 Changbai Shan, Jilin	Gao L. M. 20046	AF393418

* KIB: Kunming Botanical Garden, Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences.

正、反链进行测定并加以校准。

1.3　序列分析及系统树的构建

本文测定的序列和从GenBank获得的序列经DNASTAR软件排序，个别位点做必要的人工校正，以叶状苞杜鹃为外类群，用PAUP4.08b软件（Swofford, 2001）进行系统发育分析。采用最大简约法和最大似然法进行分析，采用启发式搜索（Heuristic search），获取严格一致树。用靴带分析（Bootstrap analysis, 1000 replicates）检验简约树中各分支的支持率。

2　结果

本文测得10种杜鹃花的ITS区序列和从GenBank获得的4种杜鹃花的ITS区（含5.8S）序列的长度范围为642–645 bp。当空位（gap）作为缺失处理时，ITS区全序列排序后的长度为651位点，其中有31个变异位点，22个为系统发育的信息位点，分别占4.76%和3.38%；ITS1的长度范围为253–256 bp，排序后长度为261位点，变异位点占6.90%，信息位点占4.21%；ITS2的长度均为225bp，排序后长度为226位点，变异位点占5.75%，信

表2 13种杜鹃花属植物的ITS1和ITS2的长度和G+C含量

Table 2 The size and G+C content of ITS1 and ITS2 of the 13 species of *Rhododendron* studied

类群 Species	ITS Size (bp)	ITS-1 Size (bp)	 G+C (%)	ITS-2 Size (bp)	 G+C (%)
R. ovatum	643	254	52.36	225	58.67
R. bachii (Ⅰ)	644	255	52.16	225	58.22
R. bachii (Ⅱ)	643	254	52.36	225	57.78
R. lamprophyllum	643	254	52.76	225	58.22
R. hongkongense	643	254	51.57	225	57.78
R. mitriforme	644	255	52.16	225	58.22
R. mitriforme var. *setaceum*	644	255	52.16	225	58.22
R. leptothrium	642	253	51.78	225	58.67
R. vialii	642	253	52.17	225	58.22
R. stamineum	644	255	51.37	225	56.44
R. tutcherae	643	254	51.18	225	56.44
R. semibarbatum	643	254	52.76	225	58.22
R. albiflorum	642	253	50.99	225	56.89
R. redowskianum	645	256	52.34	225	58.22

息位点占4.87%；空位作为新性状(new state)处理时，ITS区排序后的长度也为651个位点，其中有39个变异位点，25个为系统发育的信息位点，分别占5.99%和3.84%；5.8S rDNA长度均为164 bp，无碱基差异。14种杜鹃花ITS1和ITS2的长度和G+C含量见表2，ITS1的长度为253－256 bp，相差3个碱基，ITS2的长度相同，均为225 bp。马银花组内种间的相对遗传距离为0－1.248%，长蕊杜鹃组和马银花组之间的相对遗传距离为2.336%－2.808%，外类群叶状苞杜鹃与内类群间的相对遗传距离为2.969%－4.844%。

以叶状苞杜鹃为外类群，当空位作缺失处理时，用最大简约法(启发式搜索)获得6个最简约树，简约树长度为60步，一致性指数(*CI*)和维持性指数(*RI*)分别为0.917和0.898，利用6个最简约树获取严格一致树，如图1所示。马银花组构成一单系分支，内部支持率为81%，分支内又分为两支，一支为产于云南的红马银花和薄叶马银花，另一分支则由其他种类构成，其内部支持率分别为62%和93%；异蕊杜鹃亚属形成马银花组的姐妹群，支持率为75%。长蕊杜鹃组构成异蕊杜鹃亚属和马银花组的姐妹群。当空位作为新性状处理时，得到3个最简约树，简约树长度为73步，*CI*和*RI*分别为0.918和0.906，其严格一致树与空位作缺失处理时完全相同，各分支的支持率见图1。用最大似然法分析，经启发式搜索得到1个最简约树，拓扑结构与图1完全相同，只是支持率略有不同。

3 讨论

Sleumer(1949)将花序腋生、叶不被鳞片的类群放入马银花亚属，并根据常绿或落叶、雄蕊数目、花萼及种子的特征等分为4个组。而Philipson和Philipson(1986)根据落叶习性、雄蕊二型及独特的地理分布将异蕊杜鹃组和纯白杜鹃组提升为亚属等级。基于*mat*K基因及*trn*K序列和ITS序列的分析表明，无论Sleumer系统中的马银花亚属，还是Philipson和Philipson系统中的马银花亚属都不是一个单系类群(Gao et al.，2002；Kurashige et al.，2001；Kurashige et al.，1998)。在本文基于ITS序列的分析中(图1)，产北美的纯白杜鹃亚属位于分支图的最基部；长蕊杜鹃组构成异蕊杜鹃亚属和马银花组的姐妹群，支持率仅为66%；长蕊杜鹃组和马银花组分别构成单系类群，其内部支持率分别为100%和81%。

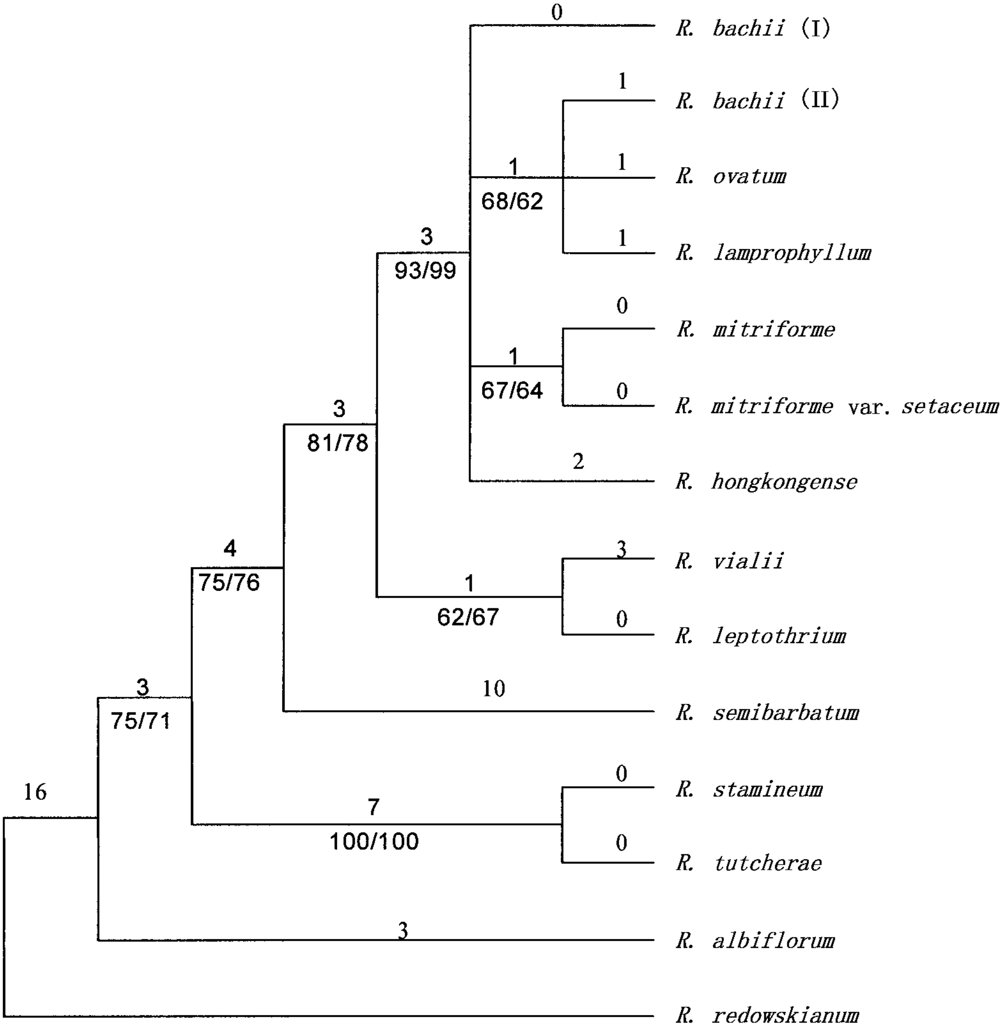

图 1　当空位作缺失处理时，基于 ITS 序列分析得到的 6 个最简约树的严格一致树（步长为 60，一致性指数（*CI*）为 0.917，维持性指数（*RI*）为 0.898）。分枝上面的数值表示枝长变化，分枝下面的数值代表靴带支持率，其中斜线前面的数值代表空位作缺失时的支持率，斜线后的数值代表空位作新性状时的支持率。

Fig. 1.　The strict consensus tree of six equally most parsimonious trees based on ITS sequences with all characters equally weighted and gaps treated as missing data (Length = 60, *CI* = 0.917, *RI* = 0.898). Numbers above branches are base substitutions; those below branches are bootstrap values (%) with 1000 replicates; numbers before diagonal are bootstrap values when gaps treated as missing data and those behind diagonal are bootstrap values when gaps treated as new state.

产自日本的异蕊杜鹃亚属与马银花组形成姐妹群，内部支持率为 75%，属中度支持。异蕊杜鹃亚属和马银花组可能有较近的系统学关系（Gao et al., 2002），在形态上也得到部分支持，如花序单花，雄蕊 5 枚，子房卵圆形，被腺毛等特征，但与基于 *mat*K 基因和 *trn*K 序列分析的结果有所不同（Kurashige et al., 2001；Kurashige et al., 1998）。综合多方面资料，将 Sleumer 系统中马银花亚属的 4 个组都提升为亚属等级可能更为合理，但还需更多的证据进行分析（高连明，2002）。

马银花组是一单系类群得到支持，内部支持率为 81%，在马银花组内部分成两支，一

支由红马银花和薄叶马银花组成，另一支则由腺萼马银花、马银花、白马银花、头巾马银花 *R. mitriforme* 及其变种腺刺马银花 *R. mitriforme* var. *setaceum* 组成，空位作缺失处理时，内部支持率分别为 62%和 93%。空位作为新性状时，拓扑结构完全相同，两个分支的支持率分别为 67%和 99%（图 1）。红马银花花冠钟形、裂片比筒部短、深红色、花萼边缘密被短柄腺体等特征与本组其他种类差别较大。红马银花与薄叶马银花在形态上虽然有较大的差异，但在分支图上，二者聚为一支，支持率为 62%，它们的 ITS 长度相同，G + C 含量也非常相近（表 2），红马银花与薄叶马银花之间可能具有较近的亲缘关系。在地理分布上，红马银花与薄叶马银花都分布于云南省，薄叶马银花分布在滇西北至滇中（景东），红马银花分布在滇南地区，呈水平替代现象，两者可能具有共同的起源。产于缅甸东北部的缅甸马银花和西藏东南部的墨脱马银花 *R. medoense*（本实验中没有取材）在地理分布上位于薄叶马银花分布区的边缘，形态特征与薄叶马银花十分相近，这 2 个种可能由薄叶马银花分化而来。

由马银花和白马银花等种类组成的另一分支，其内部支持率为 93%，当空位作新性状时，这一分支的支持率高达 99%（图 1），表明这一支具有共同的起源。这些种类分布于华东、华中和华南，少数种向西扩散到四川和贵州，但不达云南。在分支内又分出 4 个平行的小分支，其中，腺萼马银花产广西金秀的居群 *R. bachii*（I）和白马银花各成一分支，腺萼马银花产于广西灵川的居群 *R. bachii*（II）、马银花和长卵叶马银花聚为一支，内部支持率为 68%，头巾马银花及其变种聚为一支，支持率为 67%（图 1）。腺萼马银花产于广西灵川的居群与产于广西金秀的居群没有聚为一支，这可能由本种在不同居群的独立分化或者居群间的基因交流受限所致。腺萼马银花产于广西灵川的居群、马银花和长卵叶马银花在形态上非常相似，Philipson 和 Philipson（1986）、徐炳声和顾德兴（1984）曾将腺萼马银花和长卵叶马银花归并入马银花中，基于 ITS 序列分析，支持将这 3 种杜鹃花归并。在系统树中，种间的演化关系并没有得到很好的解决，可能由于 ITS 序列不能够提供足够多的系统发育信息所致。从分布区来看，马银花可能最先分化出来，由它进一步分化出白马银花和头巾马银花。头巾马银花与其变种腺刺马银花仅分布于广西东部、东北部和湖南西南部的局部地区，分布区较狭窄。虽在形态上有一定的差异（头巾马银花以花冠粉白色、花梗光滑等特征与其变种相区别），但 ITS 区序列完全相同，表明它们可能是新近发生的类群。在 ITS 长度和 G + C 含量方面，头巾马银花与腺萼马银花产于广西金秀居群的相同，序列相似性高达 99%，分布区又相同，头巾马银花可能是由腺萼马银花演化而来，或者基因交流频繁。鉴于头巾马银花与马银花在形态上存在一定的差异，很容易将两者区分开，建议将头巾马银花作为 1 个独立的种处理。结合形态分析，我们认为马银花组目前应包括 7 种 1 变种。

致谢 中国科学院昆明植物研究所方瑞征研究员审阅全文并提出宝贵意见，英国爱丁堡皇家植物园 David Paterson、Tony Garn 和 Philip Ashby 诸先生以及中国科学院沈阳应用生态研究所陈玮副研究员、昆明植物研究所张启泰副研究员提供部分实验材料，在此深表谢意 感谢昆明植物研究所生物多样性生物地理开放实验室的杨俊波、陈永燕、田欣、郭振华等同事在分子生物学实验中给予的帮助。

参 考 文 献

Baldwin B G, Sanderson M J, Potrer J M, Wojciechowski M F, Campbell C S, Donoghue M J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247 – 277.

Chamberlain D F, Hyam R, Argent G, Fairweather G, Walter K S. 1996. The Genus *Rhododendron*, Its Classification and Synonymy. Oxford: The Alden Press.

Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11 – 15.

Fang W-P(**方文培**), He M-Y(**何明友**). 1982. Study on the genus *Rhododendron* (I). Bulletin of Botanical Research 2(2): 81 – 103.

Fang W-P(**方文培**), He M-Y(**何明友**). 1983. Studies on the genus *Rhododendron* (III). Bulletin of Botanical Research 3(1): 1 – 8.

Gao L-M (**高连明**). 2002. Phylogeny and geographical distribution of *Rhododendron* subg. *Azaleastrum* sens. Sleumer (Ericaceae). Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences. Ph. D. thesis.

Gao L-M, Li D-Z, Zhang C-Q, Yang J-B. 2002. Infrageneric and sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data. Acta Botanica Sinica 44: 1351 – 1356.

Gao L-M(**高连明**), Yang J-B(**杨俊波**), Zhang C-Q(**张长芹**), Li D-Z (**李德铢**). 2002. Phylogenetic relationship of subgenus *Tsutsusi* (*Rhododendron*) based on ITS sequences. Acta Botanica Yunnanica (**云南植物研究**) 24: 313 – 320.

He M-Y(**何明友**), Fang M-Y (**方明渊**), Hu W-G(**胡文光**), Hu L-Z(**胡琳贞**). 1994. Ericaceae. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press. 57(2): 340 – 366.

Hsu P-S(**徐炳声**), Gu D-X(**顾德兴**). 1984. A quantitative analysis of the variation pattern of some characters of *Rhododendron ovatum* Planch. Guihaia (**广西植物**) 4: 269 – 276.

Kurashige Y, Mine M, Kobayashi N, Handa T, Takayanagi K, Yukawa T. 1998. Investigation of sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) based on *mat*K sequences. Journal of Japanese Botany 73: 143 – 154.

Kurashige Y, Etoh J I, Handa T, Takayanagi K, Yukawa T. 2001. Sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae): evidence from *mat*K and *trn*K intron sequences. Plant Systematics and Evolution 228: 1 – 14.

Philipson W R. 1980. Problems in the classification of the *Azalea* complex. In: Luteyn J L, O' Brien M E eds. Contributions Toward a Classification of *Rhododendron*. New York: The New York Botanical Garden. 53 – 62.

Philipson W R, Philipson M N. 1986. A revision of *Rhododendron*. III. Subgenera *Azaleastrum*, *Mumeazalea*, *Candidastrum* and *Therorhodion*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 44: 1 – 23.

Sanger F, Nicklen S, Coulson S R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463 – 5467.

Sleumer H. 1949. Ein System der Gattung *Rhododendron* L. Botanische Jahrbücher 74: 511 – 553.

Sleumer H. 1980. Past and present taxonomic systems of *Rhododendron* based on macromorphological characters. In: Luteyn J L, O' Brien M E eds. Contributions Toward a Classification of *Rhododendron*. New York: The New York Botanical Garden. 19 – 26.

Swofford D L. 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4.0b8. Sunderland: Sinauer.

Tam P-C(**谭沛祥**). 1982. Notes on rhododendrons of Eastern and Southern China. Bulletin of Botanical Research 2(4): 77 – 98.

Tam P-C(**谭沛祥**). 1983a. Studies on *Rhododendron* from Guangxi (II). Guihaia (**广西植物**) 3: 177 – 187.

Tam P-C(**谭沛祥**). 1983b. A survey of the genus *Rhododendron* in South China. Hong Kong: World Wide Publications. 67 – 72.

Tian X(**田欣**), Li D-Z(**李德铢**). 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study. Acta Botanica Yunnanica (**云南植物研究**) 24: 170 – 184.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press. 315 – 322.